

カンナビノイド2受容体選択的アゴニスト代謝物の 生成機序およびその予測精度向上に関する研究

関口 和孝

緒言

通常、生体内に投与された医薬品は、肝臓や小腸などで水溶性の高い代謝物へと変換される。一方、acetaminophenなどの医薬品において、未変化体そのものは毒性がないが、代謝過程で生成する代謝物が毒性を有することも知られている。現在、ヒト特有代謝物や多剤併用時の薬効変動、副作用発現の観点からリスクの少ない医薬品が望まれている。以上のことから、安全でリスクの低い医薬品を創製するためには、非臨床段階において、ヒトで生成する代謝物を精度高く予測し、ヒトに対する代謝物の影響を把握することが重要と考えられる。

1-((6-ethyl-1-(4-fluorobenzyl)-5-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonyl)amino)-cyclohexanecarboxylic acid (S-777469) は、カンナビノイド2受容体選択的アゴニストであり、アトピー性皮膚炎、掻痒治療薬として開発中である。非臨床段階での代謝物分析の結果、ヒト凍結肝細胞における主代謝物は5位-水酸化体(5-HM)であった(Fig. 1)。また、5-HMは非臨床動物の肝細胞でより多く生成すること、非臨床動物における代謝物生成に肝細胞、血漿で差はなかったことから、臨床においても本代謝物の生成が示唆された。しかし、第I相臨床試験の結果、ヒト血漿における主代謝物は5-HMが二次代謝を受けた5位-カルボン酸体(5-CA)であった(Fig. 1)。また、ヒト肝細胞における5-CA生成量は全体の1%未満であり、ヒト肝細胞(*in vitro*)/臨床(*in vivo*)間で代謝物プロファイルに乖離が認められた。そこで、本研究では、臨床における代謝物生成の予測精度向上を目的に、本薬剤の臨床結果、ヒト組織画分を用いた*in vitro*代謝試験の結果から、5-CAの生成機序および*in vitro/in vivo*間における代謝物生成の乖離の原因を検討した。さらに、代謝物生成予測に対する培養細胞およびヒト肝細胞移植マウス(ヒト肝キメラマウス)の有用性についても検証を加えた。

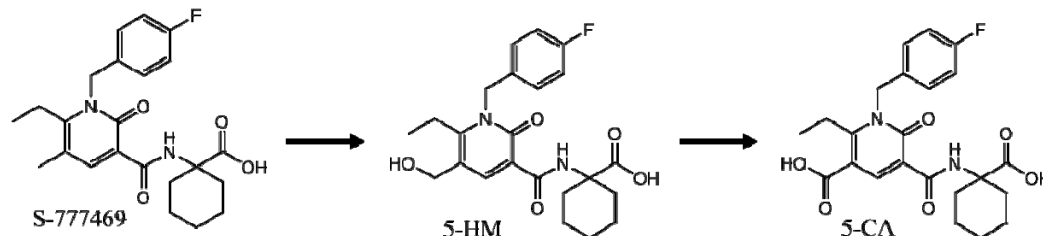


Fig.1 Structure of S-777469 and its major oxidative metabolites

1. *In vitro/in vivo* 間で認められた S-777469 代謝物プロファイルの乖離の精査

代謝物プロファイルに*in vitro/in vivo*で乖離がある場合、代謝物の消失半減期が未変化体より長くなり生体内で蓄積した可能性や基質濃度や反応時間など*in vitro*試験系の条件が*in vivo*条件を反映していない可能性、*in vitro*試験系では検出が困難な代謝反応が*in vivo*で起きた可能性などが考えられる。そこで、臨床における本薬剤の薬物動態パラメーターを基に、*in vitro/in vivo*間で見られた代謝物プロファイルの乖離の原因を精査した。その結果、ヒト血漿からのS-777469, 5-HM, 5-CAの消失半減期は 7.6 ± 3.7 , 8.8 ± 4.6 , 9.1 ± 5.1 hrと同程度であり、代謝物の蓄積はないと考えられた。また、本薬剤の*in vitro*代謝試験時の基質濃度およびヒト肝臓中濃度は20, 11 μM と大きな乖離はないこと、*in vitro*代謝試験時の反応時間および5-CAの T_{max} はそれぞれ4, 6 hrと同程度であったことから、*in vitro*代謝試験の条件は臨床での代謝物生成の検討に充分であると考えられた。これらのことから、*in vitro/in vivo*間で認められたS-777469代謝物プロファイルの乖離の原因は*in vitro*試験系では検出が困難な代謝反応が*in vivo*で起きた可能性が高いと考えられた。

2. 臨床における S-777469 主代謝物の生成機序および *in vitro/in vivo* 乖離の原因の解明

In vitro/in vivo 間の乖離の原因は代謝物生成の乖離に起因することが示唆された。そこで、本薬剤の代謝物生成の乖離の原因を明らかにするため、5-CA およびその前駆体である 5-HM の生成に関わる薬物代謝酵素の同定を試みた。本代謝反応には cytochrome P450 (P450, CYP) や alcohol dehydrogenase など複数の代謝酵素が関与すると考えられる。これら代謝酵素は機能発現時に必要な補酵素が異なるため、まず、両代謝物生成時の補酵素依存性を検討した。その結果、両代謝物は主に P450 による代謝反応に必要な NADPH 存在下で生成した。また、組換え P450 酵素などを用いた検討から、両代謝物はともに酸性薬物を主に代謝する CYP2C9 により生成することが明らかとなった。

そこで、CYP2C9 で代謝される本薬の酸化的代謝に及ぼすウシ血清アルブミン (BSA) の影響を検討した。その結果、5-HM に関しては、BSA 添加により K_m の低下、5-CA 生成に関しては、 K_m の低下、 V_{max} の上昇が認められ、5-HM、5-CA 生成はともに BSA 添加で亢進された。つぎに、ヒト肝に多く含まれるアラキドン酸や α -リノレン酸、オレイン酸、ミリスチン酸による 5-HM、5-CA 生成阻害効果を検証したところ、両代謝物の生成はこれら脂肪酸の添加濃度依存的に減少した。以上のことから、*in vitro/in vivo* 間で認められた代謝物生成の乖離の原因は、*in vitro* での CYP2C9 の酵素機能が抑制的に観察されたためと推察された。

3. HepaRG 細胞およびヒト肝細胞移植マウスを用いた S-777469 代謝予測

臨床における代謝物生成を精度高く予測するため、培養可能なヒト HepaRG 細胞の有用性を評価した。その結果、S-777469 添加 4 時間後、HepaRG 細胞における 5-CA 生成量は、調べたヒト凍結肝細胞における 5-CA 生成量の 8.4 倍であった。さらに、ヒト肝臓がマウス個体にて再構築されアルブミン合成など肝機能が維持されたヒト肝キメラマウスにおける S-777469 代謝物生成を評価した。その結果、ヒト肝キメラマウス血漿における主代謝物はヒトと同じ 5-CA であり、S-777469、5-HM および 5-CA の総曝露に対する 5-CA の曝露比は 69.6% であった。また、その曝露比はコントロールマウスにおける曝露比に比較して 5.8 倍高かった。以上のことから、HepaRG 細胞およびヒト肝キメラマウスはともに、ヒト凍結肝細胞に比較して、S-777469 の主代謝物である 5-CA をより高感度で検出することができ、臨床における代謝物プロファイルをより精度高く予測できることが示唆された。

結論

カンナビノイド 2 受容体選択的アゴニストである S-777469 において、臨床主代謝物である二次代謝物 5-CA は CYP2C9 により生成することが明らかとなった。酸性医薬品のヒト代謝物生成を精度高く予測するには、ヒト肝ミクロソームあるいは組換え CYP2C9 などの酵素源にアルブミンを添加することが必要であった。さらに HepaRG 細胞およびヒト肝キメラマウスは、本薬剤の代謝物生成をより高感度で検出することができ、臨床での代謝物プロファイルをより精度高く予測できることが示唆された。以上、本研究によって、S-777469 代謝物の生成機序および *in vitro/in vivo* 間で認められた代謝物生成の乖離の原因が明確となるとともに、代謝物生成の予測精度向上に貢献する重要な因子を明らかにした。すなわち、酸性医薬品においては、アルブミン添加肝ミクロソームやアルブミン合成が維持された試験系を医薬品開発領域における代謝物評価に導入することが重要であることが判明した。これらの新知見は、ヒト型代謝物の評価やリスクの低い医薬品の創製につながる極めて重要な情報になるとともに、生体での P450 の機能解明の基盤研究に役立つものと考えられた。

本研究の誌上発表

- K. Sekiguchi, T. Kanazu, M. Takeuchi, H. Hasegawa, Y. Yamaguchi. (2014) Non-clinical evaluation of the metabolism, pharmacokinetics and excretion of S-777469, a new cannabinoid receptor 2 selective agonist. *Xenobiotica*. **44**(1):48-58.
- K. Sekiguchi, K. Fukumura, H. Hasegawa, T. Kanazu. (2015) The metabolism and pharmacokinetics of [14 C]-S-777469, a new cannabinoid receptor 2 selective agonist, in healthy human subjects. *Xenobiotica*. **45**(2):150-157.